

УДК 577.21+574:616-073.756.5

**ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНА НА ИНДУКЦИЮ МИКРОЯДЕР  
И АПОПТОЗА ПРИ РАДИАЦИОННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ****С.Б. Мельнов, П.М. Морозик, Н.И. Мельнова****Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова  
Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии**

Исследовалось влияние пигмента меланина на частоту формирования микроядер и индукции «генетического» апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека в условиях низкодозового радиационного воздействия. Меланин является естественным пигментом с установленной радиопротекторной активностью. Результаты исследования показали, что меланин не оказывал цитотоксического эффекта, а его введение в клеточную среду за 1 час до облучения вызывало снижение частоты формирования микроядер и уровня апоптоза в облученных малыми дозами лимфоцитах, проявляя, таким образом, возможное радиопротекторное действие.

Ключевые слова: меланин, апоптоз, микроядра, радиопротекторы, малые дозы.

**INFLUENCE OF MELANIN ON THE INDUCTION OF MICRONUCLEI  
AND APOPTOSIS AFTER RADIATION INFLUENCE****S.B. Melnov, P.M. Marozik, N.I. Melnova****International State Ecology University behave of the name A.D. Sacharov  
Republican Research Centre of Hematology and Transfusiology**

The influence of melanin pigment on micronuclei frequency and «genetic» apoptosis induction in human peripheral blood lymphocytes after low dose radiation exposure has been studied. Melanin is known to be natural substance with shown radioprotective activity. Results of the investigation revealed that melanin has no cytotoxic effect and its addition to the cell medium one hour before irradiation was accompanied by decrease of micronuclei frequency and apoptosis level in irradiated lymphocytes, thus showing radioprotective effect.

Key words: melanin, apoptosis, micronuclei, radioprotectors, low doses

**Введение**

В результате аварии на ЧАЭС в настоящее время значительная часть населения Беларуси проживает в условиях хронического низкодозового радиационного воздействия. Данный фактор может оказать критическое влияние на экологическую ситуацию в республике и вызвать резкое усиление мутагенного давления на человеческую популяцию. В связи с этим в настоящее время возникла острая проблема в поиске новых эффективных препаратов, обладающих радиопротекторной активностью, способных снижать или полностью компенсировать эффекты действия радиации на организм человека. В этом отношении особое значение приобретают естественные

нетоксичные перехватчики свободных радикалов, способные накапливаться в организме в достаточном количестве, оставаясь безвредными, не обладающие мутагенным, канцерогенным или тератогенным эффектом и обеспечивающие радиопротекторное действие. Одним из таких веществ является пигмент меланин [4, 5, 10].

По своей химической структуре меланин представляет собой конденсированные фенольные соединения и широко распространен в живой природе. В организме человека он обуславливает цвет волос, радужной оболочки глаза, кожи. В коже образование меланина является защитной реакцией организма на действие ультрафиолетового излучения [7, 8]. Кроме того, мела-

нин является антиоксидантом — он нейтрализует свободные радикалы, вызывающие цепь повреждающих реакций в ретине [14]. Он способен также захватывать и превращать в тепло все виды физической энергии, обладает способностью присоединять и отдавать электроны [13, 15]. В то же время его образование в организме придает последнему устойчивость не только к ультрафиолету, но и ионизирующей радиации, шумовой, тепловой, световой, электрической и магнитной энергии [11, 17]. Все это позволяет использовать меланин в медицинских целях (при радиотерапии) и при экологическом воздействии радиации.

Показано, что меланин очень эффективен при защите от малых доз радиации, способных вызвать генетические нарушения. При больших же дозах облучения меланин не справляется с поступающей энергией и сам способен образовывать токсичные радикалы [6]. В то же время защитное действие меланина при хроническом воздействии выше, чем при остром, и чем ниже мощность дозы, тем выше его эффективность.

Все вышесказанное позволяет сделать предположение о том, что меланин может быть эффективно использован для купирования и профилактики эффектов низкодозовых воздействий *in vivo*.

Одним из наиболее чувствительных защитных механизмов в организме, поддерживающим его «генетическую однородность», является апоптоз [3]. Апоптоз — генетически запрограммированная клеточная гибель — в первую очередь является механизмом-чистильщиком, обеспечивающим выведение и утилизацию функционально и генетически неполноценных клеток [9, 16]. Нарастание мутационного давления (например, за счет увеличения уровня облучения), без сомнения, должно сказаться на уровне апоптотических клеток и клеток с поврежденным геномом.

С целью проверки этого предположения и оценки эффективности этого препарата нами проведен анализ динамики генетически поврежденных (клетки с микроядрами) и апоптотических лимфоцитов, облученных *in vitro* на фоне меланина.

#### **Материалы и методы исследований**

В работе были использованы лимфоциты периферической крови клинически здоровых доноров, взятые стандартной вено-

пункцией и хранившиеся в гепаринизированных вакутайнерах в течение 2—3 часов перед исследованием. Клетки культивировались в среде RPMI-1640 с добавлением в стандартном соотношении эмбриональной телячьей сыворотки, фетогемагглютинина («Serva», М) и гентамицина [2]. Выделение пула лимфоцитов осуществлялось путем центрифугирования на градиенте фиколл-верографина по стандартной методике [1]. Суспензию лимфоцитов в течение одного часа инкубировали с меланином (10 мг/мл) в полной культуральной среде при 37°C и затем облучали в дозе 0,3 Гр на установке «Рокус-2» (мощность дозы — 1 Гр/мин) и культивировали в течение 10 суток. Определение уровня микроядер и апоптоза проводили методом проточной цитофлуориметрии по содержанию ДНК (интенсивности гиподиплоидного пика и анализ гиподиплоидных частиц, содержание ДНК — 2—50%).

*Схема эксперимента:* использовалось 4 серии опытов: 1) контроль (стандартная культура лимфоцитов); 2) меланин (стандартная культура лимфоцитов с добавлением меланина в выше приведенной концентрации); 3) облучение (стандартная культура лимфоцитов, облученная в указанной выше дозе); 4) облучение + меланин (стандартная культура лимфоцитов с добавкой меланина в выше приведенной концентрации, облученная в выше указанной дозе).

*Методика микроядерного теста:* микроядра — это структуры, содержащие хромосомные фрагменты или целые хромосомы (иногда группы хромосом), расположенные в цитоплазме. На стадии митоза они не включаются в клеточное ядро из-за отсутствия центромеры (ацентрические фрагменты), или повреждения нитей митотического веретена деления, или самой центромеры (целые хромосомы) [12].

*Рабочие растворы:* для обработки клеток использовались 2 раствора (оба при комнатной температуре):

*раствор I:* 584 мг/л NaCl, 1000 мг/л цитрата натрия, 10 мг/л РНКазы А (бычья поджелудочная, «Serva», Germany), 0,3 мл/л nonidet P 40 (NP 40);

*раствор II:* 0,25 М сахарозы, 15 мг/л лимонной кислоты.

*Реактивы:* ДНК-краситель (5 мг йодистого пропидия в 100 мл 1,12% цитрата натрия); раствор РНКазы (500 ед/мл в

1,12% цитрата натрия; раствор инактивировался нагреванием до 75°C в течение 30 мин.); эмбриональная телячья сыворотка; 100% этанол.

**Фиксация:** лимфоциты периферической крови человека осаждались центрифугированием (850g, 5мин.) и ресуспендировались в 500 мкл PBS, после чего охлаждались до 4—8°C. Затем клеточная суспензия ( $1 \times 10^6$  клеток) фиксировалась в 500 мкл 100% этанола и выдерживалась в течение 15 мин. при +4°— +8°C. В этом состоянии клеточная суспензия может храниться до недели. Непосредственно перед окраской и анализом клеточная суспензия дважды отмывалась фосфатным буферным раствором (PBS).

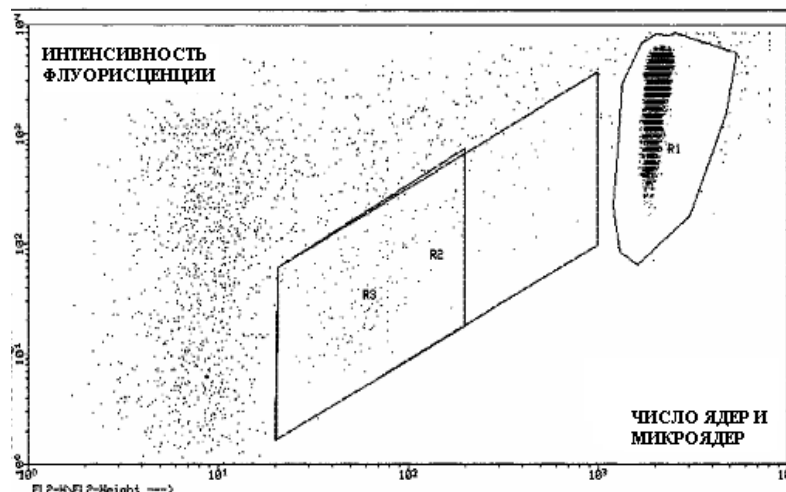
**Удаление дегриса:** клеточная суспензия переносилась в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки и центрифугировалась в течение 3 мин. (300g). Верхний слой супернатанта удаляется, и в клеточную суспензию вносится 2 мл PBS.

**Обработка проб:** примерно  $10^6$  клеток осаждались центрифугированием при 800g в течение 5 минут. Надосадочная жидкость удалялась, после чего гомогенизировался осадок в минимальном количестве среды (около 50 мкл). Клетки ресуспендировались в 50 мкл среды RPMI-1640. Затем к клеточному осадку добавлялся 1 мл рас-

твора I, содержащего 10 мкг/мл РНК-азы (готовился перед употреблением, подвергался термической обработке и стерилизовался фильтрованием через стерильный фильтр 0,22 мкм). Полученную суспензию встряхивали на вортексе 2 сек. Затем смесь инкубировалась 1 час и в нее добавлялся 1 мл раствора II, содержащего 10 мг/мл бромистого этидия (готовится перед употреблением и фильтруется). Суспензия вновь встряхивалась на вортексе.

Образец может быть использован для измерений сразу же (через 1 час после добавления раствора II), либо его можно хранить на протяжении 1—2 недель при температуре +4°— +8°C. Перед измерениями проверяли суспензию под флуоресцентным микроскопом, оснащенным дополнительной фазово-контрастной оптикой. Препарат хорошего качества использовался как эталон при проведении измерений на проточном цитофлуориметре других образцов. Благодаря тому, что суспензия ядер и микроядер может храниться 1—2 недели, подобный образец может быть использован и для настройки аппаратуры.

**Анализ данных:** анализ проводился на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (Becton Dickinson) с использованием аргонового лазера 1 W 488 нм. Принцип сбора данных представлен на рис.1.



**Рис. 1:** Принцип анализа данных при микроядерном тесте с использованием проточной цитофлуориметрии. Каждая точка — это ядро, микроядро или дегрис. Статистически по содержанию ДНК (интенсивности флуоресценции) и количеству частиц основная область состоит из ядер (R1). Область от R2 до R3 содержит микроядра с разным содержанием ДНК.

Частота микроядер определялась статистически с использованием компьютерной программы. Во избежание возможных ошибок одновременно детектируется переднее и боковое рассеивание света от флуоресцентного красителя.

Методика анализа уровня «генетического» апоптоза.

Анализ данных: сбор и анализ данных проводились с помощью программы LYSYS II (Becton Dickinson). Измерение проводили на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (Becton Dickenson), используя для возбуждения 488 нм 1 W аргоновый лазер.

Основным признаком апоптоза является фрагментация ДНК («генетический» апоптоз). После фиксации этанолом фрагменты ДНК вымываются из ядер PBS. После окраски йодистым пропидием апоптозные клетки, имеющие пониженную флуоресценцию, наблюдаются в виде суб-G<sub>1</sub>-пика (рис. 2). Иногда суб-G<sub>1</sub>-пик слабо отличается от G<sub>1</sub>-пика. В таком случае он анализируется автоматически компьютерной программой путем сравнения со стандартизированным диплоидным пиком. Таким образом, анализируется частота клеток с содержанием ДНК менее 2n (DI, т.е. содержание ДНК в анализируемой клетке, менее 1).

В анализ брали не менее 10000 событий.

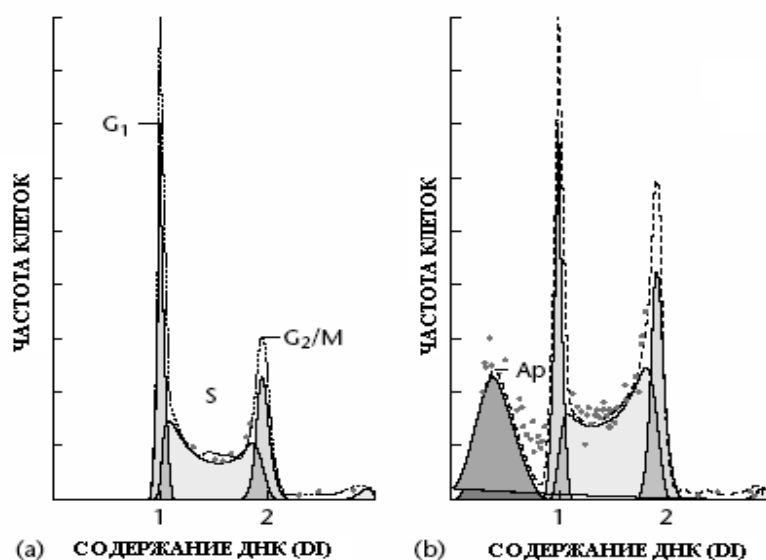


Рис.2. Принцип анализа данных при изучении индукции генетического апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.

В работе был использован меланин из шерсти животных (Белорусская фармакологическая ассоциация).

Статистический анализ: все эксперименты дублировались не менее 3 раз. Данные представлены как процентное соотношение количества диплоидных клеток к гиподиплоидным в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Достоверность различий определялась с помощью t-теста. При обработке полученных результатов использовались пакеты статистического анализа STATISTICA 5.0 и Microsoft Excel.

### Результаты и обсуждение

Микроядерный тест в последние годы получил достаточно широкое распространение благодаря его простоте и нетрудоемкости по сравнению с любым типом анализа хромосомных aberrаций.

В данной работе использовался цитофлуориметрический метод подсчета микроядер, который благодаря полной автоматизации позволяет проводить анализ большого количества событий, что существенно повышает точность метода.

Результаты проведенных исследований суммированы на рисунке 3 и в таблице 1.

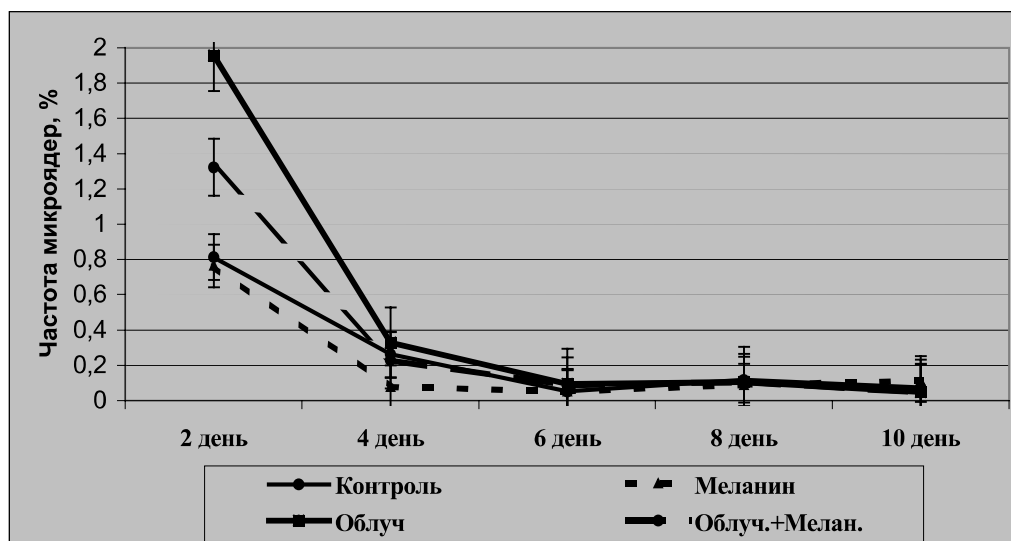
Таблица 1

**Динамика частоты микроядер в лимфоцитах периферической крови при дополнительном облучении и воздействии меланина**

	Частота микроядер, %			
	Контроль	Меланин	Облучение	Облучение + Меланин
2 дня	0,8133± 0,13	0,7623± 0,12	1,9559± 0,20	1,3233± 0,16
4 дня	0,2616± 0,07	0,0783± 0,04	0,3273± 0,08	0,2282± 0,07
6 дней	0,0505± 0,03	0,0504± 0,03	0,0930± 0,04	0,0857 ±0,04
8 дней	0,1173± 0,05	0,0873± 0,04	0,1062± 0,04	0,1061± 0,04
10 дней	0,0750± 0,04	0,1109± 0,05	0,0496± 0,03	0,0466± 0,03

Анализ частоты микроядер (табл. 1) подтвердил ранее отмеченную закономерность об эффективности указанного подхода только в период физиологически активной пролиферации (3—4 день). Тест теряет свою чувствительность на более поздних периодах из-за деструктивных процессов в клетках. Частота микроядер в облученных клетках в этот период увеличивается на 27% ( $0,33\pm 0,08$ ) по сравнению с контролем

( $0,26\pm 0,07$ ). Введение меланина в среду необлученных клеток существенно снижало частоту микроядер даже относительно контроля ( $0,078\pm 0,04$ ,  $P<0,05$ ), возможно, из-за антиоксидантного действия меланина. Введение меланина в среду облученных клеток за 1 час до облучения снижало частоту микроядер практически до уровня контроля ( $0,23\pm 0,07$ ), подтверждая, таким образом, его радиопротекторную активность.



**Рис. 3.** Влияние облучения и меланина на частоту микроядер в лимфоцитах периферической крови человека.

Таким образом, как видно из рисунка 3, наблюдается высокое, статистически значимое ( $P<0,01$ ) увеличение частоты микроядер в облученных клетках по сравнению с контролем. В то же время меланин, введенный перед облучением в среду лимфоцитов, блокирует данный эффект и, как следствие, снижает частоту микроядер ( $P<0,05$ ).

Нормальная активность организма и всех его систем поддерживается, в первую очередь, обновлением тканей — балансом между пролиферацией и гибелью клеток в физиологически активных тканях, важнейшую роль в поддержании которого играет апоптоз.

Апоптоз играет очень важную роль в опосредовании последствий радиационно-

го воздействия, включая синдромы ускоренного старения и физиологического истощения функционально активных тканей. В первую очередь это определяется тем, что одной из основных функций апоптоза является элиминация генетически неполноценных клеток, к числу которых отно-

сятся и клетки с микроядрами. Таким образом, нарастание частоты клеток с микроядрами должно быть сопряжено с нарастанием уровня апоптозных клеток.

В таблице 2 суммированы полученные нами данные по уровню апоптозных клеток в обследованных клеточных популяциях.

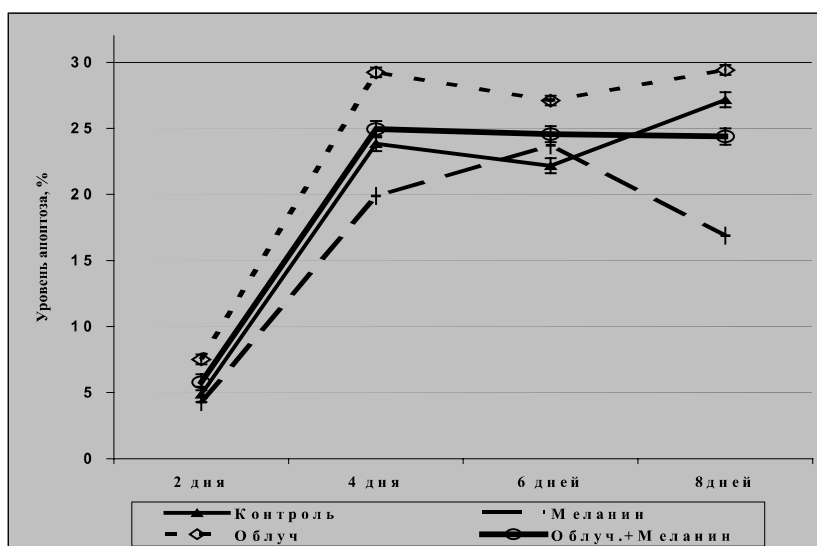
Таблица 2

**Уровень экспрессии «генетического» апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека.**

	Контроль	Меланин	Облучение	Облучение + Меланин
2 дня	4,86±0,30	4,27±0,29	7,51±0,37	5,78±0,33
4 дня	23,85±0,60	19,89±0,57	29,24±0,64	24,94±0,61
6 дней	22,17±0,59	23,71±0,60	27,11±0,63	24,57±0,61
8 дней	27,17±0,57	16,89±0,57	29,42±0,30	24,39±0,61

Данные, представленные в таблице 2 и на рисунке 4, указывают, что даже в контроле уровень «генетического» апоптоза увеличивается с каждым клеточным делением. Это является следствием снижения проли-

феративной активности клеток и усиления деструктивных процессов. Поскольку клетки стимулировались фитогемагглютинином, пролиферативная активность достигала максимума на 3—4 день культивирования.



**Рис. 4.** Влияние облучения и меланина на уровень апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека.

Введение меланина в культуральную среду лимфоцитов периферической крови человека снижало число апоптотических клеток (19,89±0,57) по сравнению с контролем (23,85±0,6, P<0,05) на 4 день культивирования. Это, возможно, связано с антиоксидантным эффектом действия меланина.

Облучение клеток вызывало увеличение числа апоптотических клеток на 23%

(29,24±0,64, P<0,05) в сравнении с контролем. Введение меланина за 1 час до начала облучения в среду снижало количество апоптотических клеток на 15% (24,94±0,61) в сравнении с клетками, облученными без введения меланина в среду перед облучением. Однако все равно уровень апоптоза в облученных клетках с введением меланина за 1 час до облучения был на 5% выше, чем в

необлученных клетках контроля, и на 25% выше, чем уровень апоптоза в необлученных клетках с введением меланина.

Таким образом, анализ популяционных данных указывает на значительное увеличение ( $P < 0,05$ ) уровня апоптотических клеток в популяции облученных клеток. В то же время введение меланина в культуральную среду облученных клеток за 1 час до облучения практически компенсирует этот эффект — изучаемые параметры практически не отличаются от таковых в контрольных популяциях ( $P > 0,05$ ) клеток.

### Выводы

Анализ частоты микроядер и уровня «генетического» апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека показал:

1. Введение меланина в среду необлученных клеток не проявляет цитотоксического эффекта и снижает частоту микроядер и уровень апоптоза ниже уровня контроля.

2. Облучение в дозе 0,3 Гр значительно повышает частоту формирования микроядер и количество апоптотических клеток.

3. Введение меланина в культуральную среду облученных клеток за 1 час до облучения снижает частоту микроядер и уровень генетического апоптоза практически до уровня контроля.

4. Одновременно наблюдаемая нормализация частоты формирования микроядер и уровня генетического апоптоза в лимфоцитах периферической крови человека указывает на проявление радиопротекторной активности меланина и возможность его применения для устранения отдаленных эффектов действия радиации, таких как синдром ускоренного старения и синдром физиологического истощения пула функционально активных клеток.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Методы оценки иммунного статуса. Под ред. Караулова А.В. // Клиническая иммунология и аллергология. — 2003. — С.361—363.
2. Мельнов С.Б. Биологическая дозиметрия: теоретические и практические аспекты // Белорусский комитет «Дети Чернобыля», Минск. — 2002. — 192 с.
3. Мельнов С.Б. Молекулярно-генетические эффекты экологического неблагополучия (возможности проточной цитофлуориметрии) // Белорусский комитет «Дети Чернобыля», Минск. — 2004. — 294 с.
4. Моссэ И.Б. Радиация и наследственность. Генетические аспекты радиационной защиты.

Изд. «Университетское», Минск. — 1990.

5. Berdishev G.D. About protective action of melanin in irradiated mice // *Radiobiologia*. — 1964. — Vol. 4 — P.644—645.

6. Chedekel M.R. Photophysics and photochemistry of melanin // In: Zeise L., Chedekel M.R., Fitzpatrick T.B. *Melanin: Its Role in Human Photoprotection*. — Valdenmar Publishing Company, Overland Park, Kansas. — 1995. — P. 11—22.

7. Crippa P.R., Cristofolletti V., Romeo N. A band model for melanin deduced from optical absorption and photoconductivity experiments // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1978. — Vol. 538. — P. 164—170.

8. Ishii T. Structure and Function of Melanin // Jimbo K., Ed.; Fuji, Ltd.: Sapporo, Japan. — 1984. — P. 43—48.

9. Kerr J.R.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Br. J. Cancer*. — 1972. — Vol. 26. — P. 239—257.

10. Mosse I.B., Dubovic B.V., Plotnikova S.I., Kostrova L.N., Subbot S.T. Melanin decreases remote consequences of long-term irradiation // *Proc Int Congress on Radiation Protection Austria, Vienna*. — 1996. — Part 4.

11. Pathak M.A. Functions of melanin and protection by melanin // In: Zeise L., Chedekel M.R., Fitzpatrick T.B. *Melanin: Its Role in Human Photoprotection*. Valdenmar Publishing Company, Overland Park, Kansas. — 1995. — P. 125—135.

12. Prosser J.S., Mognet J.E., Lloyd D.C., Edwards A.A. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes // *Mut. Res.* — 1988. — Vol. 199. — № 1. — P. 37—45.

13. Reszka K, Jimbow K. Electron donor and acceptor properties of melanin pigments in the skin // In: Fuchs J, Packer L. *Oxidative Stress in Dermatology*. Marcel Dekker, Inc. New York. — 1993. — P. 287—320.

14. Rozanowska M., Sarna T., Land E., Truscott G. Free radical scavenging properties of melanin; interaction of eu- and pheomelanin models with reducing and oxidizing radicals // *Free Rad Bio Med*. — 1999. — Vol. 26. — P. 518—525.

15. Wolbarsh M.L., Walsh A.W., George G. Melanin, a unique biological absorber // *Appl. Opt.* — 1981. — Vol. 20. — P. 2184—2186.

16. Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis // *International Review of Cytology*. — 1980. — Vol. 68. — P. 251—306.

17. Zeise L., Chedekel M.R., Fitzpatrick T.B. *Melanin: Its Role in Human Protection* // Valdenmar Press: Overland Park, KS. — 1995.